ÜBER PHOSPHORSÄURE- UND SCHWEFELSÄUREESTER VON KOHLENHYDRATEN UND ÜBER DIE PHOSPHORYLIERUNG VON EIWEISS

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

GENEHMIGT

VON DER PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT
ZU BERLIN

ACAD. LANDWIRT. BIBL.

Von

HERMANN POLLAK
aus Wiesbaden

Tag der Promotion: 13. August 1910.

273

Referenten:

Professor Dr. S. Gabriel.
Professor Dr. W. Nernst.

Verlagsbuchhandlung von Julius Springer in Berlin.

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535712_0125

A. Über Phosphorsäure- und Schwefelsäureester von Kohlenhydraten.

Der Phosphor zählt zu den wenigen Elementen, die in der Natur in organischer Bindungsform vorkommen. Phosphorhaltige Eiweißkörper, wie das Casein und das Vitelin, und phosphorhaltige Lipoide, wie das Lecithin, sind seit langer Zeit bekannt. Jüngeren Datums ist unser Wissen von weniger kompliziert gebauten phosphorhaltigen Naturstoffen, z. B. von den Nucleinsäuren, deren einfachsten Vertreter die Inosinsäure darstellt. Alle diese Substanzen besitzen eine große biologische Bedeutung, da sie anerkanntermaßen an zahlreichen physiologischen Vorgängen beteiligt sind. Der künstliche Aufbau dieser phosphorhaltigen Naturprodukte ist bisher kaum versucht oder höchstens zu Bruchstücken gediehen; so ist die Synthese der Glycerinphosphorsäure, die einen Teil des Lecithins bildet, ausgeführt worden; allein diese künstliche Substanz ist nur ein Isomeres des Naturstoffes.

Eine besondere Beachtung verdienen die Phosphorsäureester der Kohlenhydrate. Denn nach Untersuchungen von Kossel, Bang, Steudel, Neuberg u. a. ist jetzt die Vorstellung begründet, daß den im Tier- und Pflanzenreiche weit verbreiteten Nucleinsäuren ein Kohlenhydratphosphorsäureskelett zugrunde liegt, an das sich andere Gruppen, wie Purine, Pyrimidine, angliedern, in ähnlicher Weise, wie Cholin und Fettsäuren mit der Glycerinphosphorsäure zum Lecithin verknüpft sind. Liegt einzelnen Nucleinsäuren eine Pentosephosphor-

säure[1]), anderen eine Hexosephosphorsäure[2]) zugrunde, so handelt es sich bei bestimmten phosphorhaltigen Lipoiden, die jetzt unter dem Namen Phosphatide zusammengefaßt werden, um eine Galaktosephosphorsäure. Auch im freien Zustande kommen solche Phosphorsäureester vor, wie das Beispiel des in zahlreichen Pflanzen auftretenden Phytins lehrt. Letzteres ist zwar kein Derivat der gewöhnlichen Zucker, sondern ist als Abkömmling des zyklischen Inosits, als Inositphosphorsäure[3]), erkannt.

Seit Jahrzehnten hat die Erfahrung gelehrt, daß der in organischer Bindung vorhandene Phosphor auch im intermediären Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Ist dieselbe auch nicht in ihren Einzelheiten aufgeklärt, so hat sich in einem besonderen Falle, im Stoffwechsel der Hefe, ihre Bedeutung zu erkennen gegeben. Harden und Young[4]), E. Buchner und Antoni[5]), Iwanow[6]) und v. Lebedew[7]) zeigten, daß anorganische Phosphorsäure bzw. Phosphate als sogenanntes Koenzym der Zymase bei der Alkoholbildung wirken, und Harden und Young klärten diesen Vorgang durch Isolierung von Hexosediphosphorsäure in Substanz dahin auf, daß es sich um eine vorübergehende Bildung von Phosphorsäureestern des gärenden Zuckers handelt, der im Gärungsprozeß wieder zerfällt und das Koenzym zurückbildet. Hier leitet die Phosphorsäure, die wie ein wasserentziehendes Mittel wirkt, den Zerfall des Zuckermoleküls zu den kleineren, alkoholliefernden Stücken ein.[8]) Dieser Fall zeigt, welche prinzipielle Bedeutung die Kohlenhydratphosphorsäuren im pflanzlichen Stoffwechsel[9]), speziell wohl für den Atmungsprozeß, haben können.

Wie die Kohlenhydratphosphorsäuren sind auch die Schwefelsäureverbindungen der Zuckerarten von Wichtigkeit.

---

[1]) C. Neuberg und B. Brahn, Biochem. Zeitschr. 5, 438, 1907.
[2]) H. Steudel, Zeitschr. f. phys. Chem. 48, 425, 1907.
[3]) C. Neuberg, Biochem. Zeitschr. 9, 557, 1908.
[4]) A. Harden und W. J. Young, Proc. Chem. Soc. 21, 189, 1905; 23, 65, 1907; 24, 117, 1908; Proc. Roy. Soc. 21, 528, 1909.
[5]) E. Buchner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 136, 1905; Biochem. Zeitschr. 19, 191, 1909.
[6]) L. Iwanow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 281, 1907.
[7]) A. v. Lebedew, Biochem. Zeitschr. 20, 114, 1909.
[8]) Vgl. A. Wohl, Biochem. Zeitschr. 5, 44, 1907.
[9]) Vgl. C. Neuberg, Biochem. Zeitschr. 24, 430, 1910.

Außer den von E. Baumann entdeckten gepaarten Schwefelsäuren, d. h. den Schwefelsäureestern aromatischer Hydroxylverbindungen, ist seit den Forschungen Schmiedebergs auch eine Kohlenhydratschwefelsäure bekannt, die im Knorpel vorhandene Chondroitinschwefelsäure. Allerdings ist die Konstitution der Chondroitinschwefelsäure noch nicht aufgeklärt, doch so viel ist sicher, daß in ihr der Schwefelsäureester einer stickstoffhaltigen, zur Kohlenhydratreihe zählenden Substanz vorliegt. Solche Kohlenhydratschwefelsäureester gehören nach den Untersuchungen von J. A. Mandel und P. A. Levene[1]) zu den normalen Bestandteilen zahlreicher Organe und Gewebssäfte. In der Leber, in den Leukocyten, in der Milchdrüse, in der Milz, in den Nieren, im Pankreas, im Mucin der Sehnen kommen Verbindungen vor, die Kohlenhydrate und gleichzeitig gepaarte Schwefelsäure enthalten, wenn auch im einzelnen die Natur dieser Schwefelsäureester noch unsicher ist.[2]) Synthetische Versuche zu ihrer Darstellung sind deshalb auch noch nicht unternommen. (Schwefelsäureester liegen möglicherweise auch in den Glucosiden vom Typus der Myronsäure und des Sinalbins vor.)

Aus diesen Darlegungen geht hervor, daß die künstliche Verknüpfung von Phosphorsäure mit Kohlenhydraten sowie die Darstellung von Schwefelsäureestern der Zuckerarten eine wichtige Aufgabe ist.

Nur zwei Angaben liegen darüber vor, daß die künstliche Vereinigung von Zuckern mit Phosphorsäure versucht ist. Amato[3]) erhielt durch Erwärmen von Helicin, dem Salicylaldehydglucosid, mit Phosphoroxychlorür eine amorphe phosphorhaltige Säure, die nicht ganz rein gewonnen wurde. Ihrem Natriumsalz schrieb der Autor die Formel $C_6H_{11}O_9PNa_2$ zu, und Berthelot[4]) will durch direkte Einwirkung von Phosphorsäure auf Glucose eine Verknüpfung erzielt haben. Doch hat er wie über die meisten von ihm bearbeiteten Säurederivate von Kohlenhydraten keine näheren Angaben gemacht.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 386, 1905.

[2]) J. A. Mandel und C. Neuberg, Biochem. Zeitschr. 13, 142, 1908.

[3]) Gazz. Chim. Ital. 1, 56, 1871.

[4]) Ann. d. Chim. et de Phys. III, 54, 81.

Amato wie Berthelot haben in saurer Lösung gearbeitet, und es liegt auf der Hand, daß der von ihnen eingeschlagene Weg, selbst wenn ihre Angaben zutreffend sind,[1]) bei empfindlichen Zuckerarten nicht zum Ziele führen kann. Disaccharide oder Zucker der 5-Kohlenstoffreihe werden beim Erwärmen mit Säuren hydrolysiert bzw. in Furfurol umgewandelt. Eine Synthese, die allgemeinerer Anwendung fähig sein soll, muß diese Punkte berücksichtigen, d. h., sie muß für Aldosen oder Ketosen in neutraler, bei nicht reduzierenden, aber leicht spaltbaren Zuckern vom Typus der Saccharose auch in alkalischer Lösung verlaufen. Diese Forderung wird erfüllt, wenn man Phosphoroxychlorid oder Phosphorpentachlorid bei Gegenwart säurebindender Mittel auf wässerige Zuckerlösungen einwirken läßt. Als Polyhydroxylverbindungen sind die Kohlenhydrate an sich befähigt, mehrere Säureradikale aufzunehmen. Um jedoch die Verhältnisse nicht zu komplizieren, ist die Reaktion so geleitet worden, daß sie zur Bildung eines Monophosphorsäureesters führt, d. h., es kam das Phosphoroxychlorid stets auf einen Überschuß von Zucker zur Anwendung. Wie erwähnt, ist die Anwesenheit säurebindender Stoffe notwendig. Als solche kommen bei Zuckern, die keine freie Carbonylgruppe enthalten, Laugen oder Erdalkalien in Betracht. Bei den reduzierenden Zuckern empfiehlt sich die Benutzung von Erdalkalicarbonaten bzw. von unlöslichen Metalloxyden (Magnesia, Aluminiumhydroxyd oder Zinkoxyd). Da bei der Reaktion an sich freie Salzsäure entsteht, und ein Teil des Phosphoroxy-

---

[1]) Die in der Literatur vorhandene Notiz, daß Glucophosphorsäure von Levene in der Natur aufgefunden sei, beruht auf einer Täuschung durch den Namen. Die Glucophosphoric acid genannte Substanz (Journ. of the Americ. Chem. Soc. 24, 190, 1902) enthielt als Kupfersalz 2,41% N und 57,67% Asche. In einer späteren Mitteilung über denselben Gegenstand (Amer. Journ. of Physiol. 8, 11, 1903) teilte der Autor mit, daß die Verbindung 1,8% N und 50% Asche aufweist und ihr Kohlenhydrat Pentose (nicht Glucose) sei. Levene gibt ferner an, daß es sich um die von Palladin entdeckte und von Schulze und Winterstein untersuchte Substanz handle; letztere ist aber als Inositphosphorsäure von Neuberg (Biochem. Zeitschr. 5, 443, 1907; 9, 557, 1908; 16, 406, 1909) sowie von Winterstein (Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 118, 1908) erkannt, hat also nichts mit Glucose zu tun.

chlorids sich mit Wasser zu Phosphorsäure und Chlorwasserstoff umsetzt, so ist auf die leichte Entfernbarkeit dieser Nebenprodukte Rücksicht zu nehmen. In praxi hat sich die Verwendung von Ätzkalk bzw. Calciumcarbonat am meisten bewährt. Hierbei wird auftretende anorganische Phosphorsäure in unlösliches Calciumphosphat verwandelt. Die Salzsäure gibt Calciumchlorid, das durch seine Löslichkeit in Alkohol von dem darin unlöslichen Kalksalz der Kohlenhydratphosphorsäure getrennt werden kann. Die Umsetzung[1]) vollzieht sich dann z. B. für Glucose im Sinne der Gleichung:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,POCl_3 + 5\,CaCO_3 = 5\,CO_2 + 3\,CaCl_2 + H_2O + 2\,C_6H_{11}O_5.O.PO_3Ca,$$

und für Rohrzucker:

$$2\,C_{12}H_{22}O_{11} + 2\,POCl_3 + 5\,CaO = 3\,CaCl_2 + H_2O + 2\,C_{12}H_{21}O_{10}.O.PO_3Ca.$$

Damit ist eine sehr einfache und im Prinzip vielseitiger Anwendung fähige Synthese von Kohlenhydratphosphorsäuren gegeben. Auch in andere Polyhydroxylkörper, wie Glycerin, Inosit usw., läßt sich nach diesem Verfahren Phosphorsäure einführen, ebenso in Oxysäuren.

Vor Jahren hat E. Baumann[2]) gezeigt, daß man Ätherschwefelsäuren durch Einwirkung von Kaliumpyrosulfat auf Alkaliphenolate darstellen kann. Es lag nahe, die Gewinnung von Phosphorsäureestern nicht reduzierender Kohlenhydrate auf ähnlichem Wege mit Hilfe der Alkalipyrophosphate zu versuchen. Allein das Kaliumpyrophosphat besitzt nicht eine

---

[1]) Die Phosphorylierung des Rohrzuckers geht so leicht vor sich, daß sie als Vorlesungsexperiment gezeigt werden kann. Man löst 3,6 g Rohrzucker in 30 ccm Wasser, setzt 8 ccm Natronlauge von 33% hinzu und schüttelt unter Zugabe einiger Eisstückchen mit einer Mischung von 1 ccm (= 1,69 g) Phosphoroxychlorid + 5 ccm Chloroform, die man allmählich hinzufügt. Wenn man nach einigen Minuten die von der Chloroformschicht abgehobene alkalische Flüssigkeit mit Essigsäure abstumpft, und mit überschüssiger Magnesiamixtur ausfällt, so kann man im Filtrat nach Soda-Salpeterschmelze oder nach dem Einkochen mit starker Salpetersäure wiederum Phosphorsäure, die in organischer Bindung vorhanden war, nachweisen. Durch einen blinden Versuch, Schütteln von Phosphoroxychlorid allein mit Lauge oder Ätzkalklösung, kann man zeigen, daß nur gewöhnliche Phosphate, aber keine, etwa von Magnesiamixtur nicht fällbaren Polyphosphorsäuren entstehen.

[2]) E. Baumann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 9, 1716, 1876.

solche Reaktionsfähigkeit. Es liefert vielmehr bei der Umsetzung mit Saccharaten einfach die Salze der gewöhnlichen Phosphorsäure.

Dagegen gelingt es leicht, Kohlenhydratschwefelsäureester durch Einwirkung von Kaliumpyrosulfat auf alkalische Zuckerlösungen darzustellen. Die Methode ist selbstverständlich nur bei Zuckern anwendbar, deren reaktionsfähige Aldehyd- oder Ketogruppe verstopft ist. Bei Aldosen gelingt die Einführung von Schwefelsäuren analog der Darstellung von Glucosephosphorsäure durch Einwirkung von Sulfurylchlorid oder Chlorsulfonsäure bei Gegenwart von kohlensaurem Barium oder Calcium. Diese Bildung von Kohlenhydratschwefelsäureestern wurde konstatiert, aber bisher nicht weiter verfolgt.

Schwefelsäureester der Glucose sind schon auf anderem Wege erhalten. So soll nach alten Angaben von Péligot[1]) eine Tetraglucosemonosulfosäure der Formel $(C_6H_{12}O_6)_4SO_3$ beim Lösen von Traubenzucker in kalter konzentrierter Schwefelsäure entstehen, beim Verdünnen mit Wasser jedoch zum Teil wieder zerfallen. Nach Hönig und Schubert[2]) liegt hier überhaupt kein einheitliches Produkt vor, sondern es handelt sich um Kondensationsprodukte (Reversionsprodukte), die unter der wasserabspaltenden Wirkung der Schwefelsäure entstanden sind. Glucosetetrasulfosäure der Formel $C_6H_8O_6(HSO_3)_4$ soll nach Claësson[3]) als Chlorid beim Stehen einer Lösung von Traubenzucker in Chlorsulfonsäure sich bilden. Die aus dem Chlorid erhaltene freie Säure ist sehr unbeständig, und selbst ihr Bariumsalz schwärzt sich bei kurzem Aufbewahren. Bei partieller Hydrolyse soll sie in Glucosetrisulfosäure übergehen, die beständiger zu sein scheint.

Es ist klar, daß diese Methoden auf empfindliche Zucker oder Disaccharide nicht anwendbar sind. Die Isolierung der Kohlenhydratschwefelsäureester aus dem Reaktionsgemisch von Zucker, Kaliumpyrosulfat und Lauge gründet man zweckmäßig auf die Fällbarkeit durch Bleiessig und Ammoniak. Zu diesem Zwecke ist die Lösung zunächst zu neutralisieren, durch Bariumsalz von anorganischen Sulfaten zu befreien und dann mit Bleisubacetat und Ammoniak auszufällen. Der Niederschlag, der das basische Bleisalz der Kohlenhydratschwefelsäure enthält, schließt auch Bleiverbindungen des unveränderten

---

[1]) Annal. de Chim. et de Phys. II, 67, 108.

[2]) Wiener Monatsh. 7, 474.

[3]) Journ. f. prakt. Chem. II, 20, 1.

Zuckers ein. Er wird mit Schwefelwasserstoff bei Gegenwart von Calcium- oder Bariumcarbonat zersetzt; aus dem eingeengten Filtrat vom Schwefelblei und unveränderten Erdalkalicarbonaten fällt Alkohol das Barium- bzw. Calciumsalz der Kohlenhydratschwefelsäure, das durch mehrmaliges Lösen in Wasser und erneute Fällung mit Alkohol von anhaftendem Zucker getrennt und rein erhalten wird. Bei der Saccharose verläuft die Reaktion nach dem Schema

$$C_{12}H_{22}O_{11} + K_2S_2O_7 + KOH = H_2O + K_2SO_4 + C_{12}H_{21}O_{10}.O.SO_3K.$$

Die schließlich erhaltenen Barium- und Calciumsalze sind Halbsaccharate der wahrscheinlichen Formel:

$$C_{12}H_{20}O_{10}.O.SO_3\text{—}Ba\text{—} \quad \text{bzw.} \quad C_{12}H_{20}O_{10}.O.SO_3\text{—}Ca\text{—}$$

Eine solche Zusammensetzung, d. h. Salzbildung gleichzeitig an einem alkoholischen Hydroxyl und an der eigentlichen sauren Gruppe, ist vielfach beobachtet, beispielsweise bei den komplexen Salzen der Weinsäure, bei der Chondroitinschwefelsäure[1]), beim Isoserin[2]), bei der α-Oxy-β-aminobuttersäure[3]) bei den α- und β-2-Aminoglucoheptonsäuren[4]), bei der Cysteinsäure[5]) u. a.

Die Leichtigkeit, mit der Schwefelsäure in Form von Pyrosulfaten Kohlenhydratschwefelsäureester bildet, ist sehr bemerkenswert.

Der Eintritt von Phosphorsäure bzw. Schwefelsäure ins Molekül der Kohlenhydrate hat eine auffallende Änderung des biologischen Charakters dieser Verbindungen zur Folge. So ist beispielsweise bei der Saccharosephosphorsäure wie bei der Glucosephosphorsäure die Gärfähigkeit verschwunden. Erst nach vorangegangener Abspaltung der Phosphorsäure durch chemische Mittel sind diese Verbindungen durch Hefe angreifbar. Obgleich die Phosphorsäure, wie vorher erwähnt, als Koenzym der Zymase fungiert, ist der fertige Phosphorsäure-

---

[1]) O. Schmiedeberg, Arch. f. experim. Pathol. 28, 355, 1891.

[2]) E. Fischer und H. Leuchs, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 3787, 1902.

[3]) C. Neuberg, Biochem. Zeitschr. 1, 282, 1906.

[4]) C. Neuberg und H. Wolff, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 4012, 1902 und 36, 618, 1903.

[5]) E. Friedmann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 3, 1, 1903.

ester an sich gärungsunfähig. Das steht im Einklange mit den Befunden von Harden und Young[1]), die eine Hexosephosphorsäureverbindung gerade am Ende der Zymaseeinwirkung nachwiesen. Andrerseits ist natürlich zu bedenken, daß die intermediär am Gärungsvorgang beteiligte Phosphorsäure mit anderen Hydroxylgruppen vorübergehend verestert sein kann.

Die Saccharoseschwefelsäure zeigt ein etwas anderes Verhalten gegen Hefe. Sie entwickelt langsam Kohlensäure, aber noch vor Ablauf der Gärung ist ein, wenn auch schwaches Reduktionsvermögen, aber noch keine anorganische H_2SO_4 vorhanden, was auf eine Invertasespaltung schließen läßt. Nebenher ist öfter eine Beteiligung auch des Schwefelsäurerestes am Stoffwechsel der Hefe zu beobachten. Das Gärgut riecht dann deutlich nach Schwefelwasserstoff; es scheint dabei auch Thiosulfat zu entstehen.

Experimenteller Teil.

Saccharosephosphorsäure.

Fügt man zu einer eisgekühlten Lösung von 180 g Rohrzucker in 2 l Wasser, in denen 115 g frisch geglühter Ätzkalk abgelöscht und gut suspendiert sind, tropfenweise und unter dauernder Kühlung ein Gemisch von 77 g Phosphoroxychlorid mit 250 ccm trockenem und alkoholfreiem Chloroform, so vollzieht sich nach der Gleichung:

$$2\,C_{12}H_{22}O_{11} + 2\,POCl_3 + 5\,CaO = 3\,CaCl_2 + H_2O + 2\,C_{12}H_{21}O_{10}.O.PO_3Ca$$

ein Eintritt von Phosphorsäure in das Molekül des Rohrzuckers.

Bedingung für das Gelingen der Reaktion ist, daß Rohrzucker und Ätzkalk in geringem Überschuß vorhanden sind; denn nur so wird erreicht, daß alles nicht zur Veresterung verbrauchte Phosphoroxychlorid durch Überführung in Chlorcalcium und Tricalciumphosphat unschädlich gemacht wird, und es allein zur Bildung eines Monophosphorsäureesters kommt.

Das Eintragen des Phosphoroxychlorids muß unter dauerndem Schütteln erfolgen und nimmt ungefähr 3 bis 4 Stunden in Anspruch. Nach dem letzten Zusatz verdünnt

[1]) l. c.

man aufs Doppelte mit destilliertem Wasser und läßt einige Stunden stehen. Beim nunmehrigen Filtrieren bleibt der größte Teil des Chloroforms mit den Kalksalzen auf dem Filter, der hindurchgegangene Anteil kann im Scheidetrichter abgetrennt werden. In die erhaltene Lösung leitet man Kohlensäure zur Ausfällung des Calciumhydroxyds, filtriert und dampft im Vakuum ein. Hierbei scheidet sich abermals Calciumcarbonat ab, und zwar, früheren Erfahrungen entsprechend, zum Teil in kolloidalem Zustande.[1]) Da eine Klärung durch Filtration nicht völlig gelingt, tropft man die hinreichend konzentrierte Lösung in ungefähr das 5fache Volumen absoluten Alkohol ein. Dieser fällt ein Gemisch von Calciumsalz der Saccharosephosphorsäure mit Chlorcalcium. Letzteres entfernt man durch mehrfaches Lösen in Wasser und Eintropfen in Alkohol. Im Verlauf dieser Operationen, die bis zum Eintritt gänzlicher Chlorfreiheit 5 bis 6mal wiederholt werden müssen, erhält man eine völlig klare Flüssigkeit und gewinnt das Calciumsaccharophosphat rein in einer Ausbeute von rund $^1/_3$ des Gewichts vom angewandten Rohrzucker.[2])

Das bei 90° zur Gewichtskonstanz getrocknete Kalksalz hinterläßt beim Glühen Asche, die aus Calciumpyrophosphat besteht.

0,3692 g	Substanz	ergeben	0,0930 g Asche
0,3820 g	„	„	0,0956 g „
0,2771 g	„	„	0,0311 g CaO
0,3820 g	„	„	0,0860 g $Mg_2P_2O_7$
0,9182 g	„	„	0,2096 g „
0,0639 g	„	„	0,0676 g CO_2
			0,0303 g H_2O

Die Substanz enthält bei 90° noch 2 Moleküle Wasser.

Berechnet für $C_{12}H_{21}O_{14}PCa + 2H_2O$:

$Ca_2P_2O_7$	= 25,60;	gef. 25,23 und 25,03%
Ca	= 8,07;	„ 8,02%
P	= 6,25;	„ 6,27 und 6,36%
C	= 29,03;	„ 28,85%
H	= 5,04;	„ 5,29%

[1]) C. Neuberg und B. Rewald, diese Zeitschr. 9, 549, 1908.

[2]) Eine Verarbeitung der Mutterlaugen ist angesichts des billigen Ausgangsmaterials nicht versucht worden.

Das Kalksalz der Saccharosephosphorsäure bildet ein weißes, durchaus luftbeständiges feines Pulver, das in Wasser spielend leicht löslich ist.

Die Lösung des Calciumsaccharophosphates ist optisch aktiv, und zwar beträgt die spezifische Drehung:

$$[\alpha]_{D26} + 42{,}91^{0}.$$

($l = 2$; $\alpha = + 7{,}98^{0}$; Gewicht von 0,9299 g Substanz in 10,0 ccm Flüssigkeit 10,4405 g.)

Versetzt man die Lösung von 0,4650 g Substanz in 5 ccm Wasser mit der zur Bindung des Calciums notwendigen Menge 2-n-Salzsäure und füllt mit Wasser auf 10 ccm auf, so beobachtet man eine Anfangsdrehung im 2-Dezimeterrohre von $+ 3{,}74^{0}$; nach 20 Stunden ist dieselbe auf $+ 3{,}57^{0}$ gesunken. Gleichzeitig hat die Flüssigkeit Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Mischung erlangt. Daraus folgt, daß sich die freie Saccharosephosphorsäure zersetzt, wobei gleichzeitig eine Hydrolyse des Rohrzuckerrestes eintritt. Zu demselben Resultat führt der Versuch, durch Ausfällung des Calciums mit der äquivalenten Menge Oxalsäure in der Kälte die freie Säure darzustellen. Beim Eindampfen im Vakuum hinterbleibt hierbei ein zähflüssiger saurer Sirup, der durch absoluten Alkohol und Eisessig flockig gefällt wird. Allein auch diese Substanz ist nicht rein, denn sie reduziert deutlich Fehlingsche Lösung. Demnach muß die freie Saccharosephosphorsäure als zersetzlich gelten.

Die Lösung des Calciumsaccharophosphates gibt keinen Niederschlag mit Silber-, Kupfer- und anderen Schwermetallsalzen. Auch Bleizucker und Bleiessig fällen nicht, wohl aber Bleiessig und Ammoniak, die einen massigen Niederschlag erzeugen.

Saccharosephosphorsäure gibt mit Magnesiamixtur auch beim Kochen keine Spur einer Fällung; ebensowenig mit Ammoniummolybdat; erst nach vorherigem Erhitzen in mineralsaurer Lösung fallen beide Proben positiv aus.

Nimmt man die Hydrolyse des Phosphorsäureesters mit Salz- oder Schwefelsäure vor, so tritt infolge Bildung von Huminstoffen aus der Fruchtzuckerkomponente Dunkelfärbung auf. Letztere kann man vermeiden, wenn man einige Tropfen Salpetersäure zusetzt.

Beim Kochen mit Mineralsäuren stellt sich auch Reduktionsvermögen ein, während die ungespaltene Verbindung gegen Fehlingsche Lösung absolut beständig ist. Als Derivat des Rohrzuckers zeigt die neue Verbindung die Farbenreaktion der Saccharose. (Proben von Molisch, v. Udránzsky und Seliwanow.)

Interessanterweise hebt der Eintritt der Phosphorsäure in das Molekül des Rohrzuckers die Gärfähigkeit völlig auf. Daß nicht etwa der Calciumgehalt des saccharosephosphorsauren Kalkes die Einwirkung der Hefe verhindert, ergibt sich ohne weiteres aus der Tatsache, daß nach Zusatz von ein wenig Rohrzucker dieser glatt vergärt. Wird der Phosphorsäureester vorher mit Salzsäure gespalten und die Lösung mit Soda neutralisiert, so tritt nunmehr Gärung ein.

Nimmt man die Hydrolyse des Calciumsaccharophosphates statt mit Säuren mit Alkalien bei 100° oder mit Wasser unter Druck bei 160° vor, so wird Phosphorsäure abgespalten und unzersetzter Rohrzucker zurückgebildet.

0,2096 g saccharosephosphorsaures Calcium wurden mit 8 ccm gesättigtem, alkalifreiem Barytwasser im zugeschmolzenen Rohr 6 Stunden lang im siedenden Wasserbade erhitzt. Der Röhreninhalt war völlig farblos und enthielt einen dichten Niederschlag von Barium- bzw. Calciumphosphat. Derselbe wurde abfiltriert und über die Molybdänfällung in pyrophosphorsaure Magnesia verwandelt. Gewogen wurden 0,0439 g $Mg_2P_2O_7 = 98{,}3\%$ der Theorie.

0,2131 g der Substanz wurden mit 10 ccm Wasser im Schießrohr 17 Stunden auf 160° erhitzt. In der klaren Lösung schwammen gallertige Flocken von Calciumphosphat. Zur quantitativen Bestimmung wurde der gesamte Röhreninhalt mit Barytwasser gefällt und die Niederschläge der Phosphate abfiltriert. Die übliche Bestimmung lieferte 0,0267 g $Mg_2P_2O_7$ $= 55{,}8\%$ der Theorie.

In beiden Fällen wurde das Filtrat der Bariumniederschläge mit Schwefelsäure vom Baryt befreit, mit Soda gerade alkalisch gemacht und dann mit Milchsäure schwach angesäuert. Es bestand kein Reduktionsvermögen, aber mit Hefe trat prompt Gärung ein, wodurch das Vorliegen von Rohrzucker erwiesen ist.

d-Glucosephosphorsäure.

Nach der im allgemeinen Teil angestellten Überlegung mußte zur Phosphorylierung der Glucose, das für die Saccharose angewandte Verfahren insofern geändert werden, als die Umsetzung wegen der leicht angreifbaren Aldehydgruppe nur bei neutraler Reaktion verlaufen darf. An Stelle des Ätzkalks trat Calciumcarbonat.

In einer Lösung von 180 g reinem Traubenzucker in 3 bis 4 l Wasser wurden 500 g gefälltes Calciumcarbonat fein verteilt. Dieser gut in einer Kältemischung gekühlten Suspension wurden allmählich unter ständigem Schütteln auf der Maschine (Flasche mit Bunsenventil!) kleine Mengen mit Chloroform gemischten Phosphoroxychlorids hinzugefügt. Es traten im ganzen 154 g Phosphoroxychlorid, gelöst in etwa 500 ccm Chloroform, in Reaktion. Ein Zeichen, daß das in der Mischung befindliche Phosphoroxychlorid verbraucht war, ergab sich in dem Aufhören der Kohlensäureentwicklung. Es ist wegen der Empfindlichkeit der Glucosephosphorsäure für dauernd neutrale Reaktion Sorge zu tragen; die Mischung darf zu keiner Zeit Kongopapier bläuen. Das Schütteln nahm jedesmal 8 bis 10 Stunden in Anspruch, weil sich das in Chloroform gelöste Oxychlorid mit wässeriger Calciumcarbonatsuspension wesentlich langsamer umsetzt als mit Ätzkalklösung. In Fällen, in denen die Flüssigkeit sofort nach Beendigung des Schüttelns auf das Filter gebracht worden war, bestand am andern Morgen saure Reaktion, da sich in dem durchs Filter gegangenen Chloroform noch unzersetztes Phosphoroxychlorid befunden hatte. Deswegen darf die Mischung erst nach 12stündigem Stehen über dem Calciumcarbonatschlamm filtriert werden. Der Rückstand, der sich aus übrig gebliebenem Calciumcarbonat und Calciumphosphat zusammensetzt, muß mehrfach sorgfältig mit kaltem Wasser ausgewaschen werden. Das Filtrat wurde im Vakuum zwischen 35° und 40° eingeengt; hierbei schieden sich noch Calciumcarbonat und stets auch Phosphat ab. Die gesamte Flüssigkeitsmenge wurde auf ungefähr 1 l gebracht, klar filtriert und in die 4fache Menge Alkohol eingetropft, wobei das Calciumsalz des Glucosephosphorsäureesters ausfiel. Die Lösung des glucosephosphorsauren Calciums und des Calciumchlorids weiter

einzuengen, war nicht angängig, weil sich in stärkerer Konzentration beim Eintropfen in Alkohol größere Mengen des Calciumchlorids mit ausschieden und der ausfallenden Substanz eine schmierige bis ölige Konsistenz gaben. Um das Calciumglucophosphat von mitgerissenem Calciumchlorid zu reinigen, wurde der Niederschlag auf einer Nutsche abgesaugt, im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure von Alkohol befreit, in Wasser gelöst und wiederum mit Alkohol gefällt. Dieses Verfahren muß 4 bis 5mal bis zum Verschwinden der Chlorreaktion wiederholt werden. Die Analysen der so gereinigten Substanz ergaben folgende Werte:

0,3559 g	Substanz	gaben	0,2792 g	CO_2,	0,1315 g	H_2O;
0,2125 „	„	„	0,1660 „	„	0,0840 „	„ ;
0,2469 „	„	„	0,0950 „	Asche;		
0,3246 „	„	„	0,0537 „	CaO,	0,1090	$Mg_2P_2O_7$;
0,4153 „	„	„	0,0692 „	„	0,1399	„ .

	Berechnet für $C_6H_{11}O_9PCa + 2H_2O$	Gefunden
$Ca_2P_2O_7$ =	38,02%	38,47%
Ca =	11,97%	11,83%, 11,92%
P =	9,28%	9,35%, 9,41%
C =	21,55%	21,40%, 21,31%
H =	4,49%	4,13%, 4,42%.

Eine direkte Wasserbestimmung war unmöglich, da das H_2O erst bei Temperaturen entweicht, wo die Substanz bereits unter Bräunung Phosphorsäure abspaltet.

Die Ausbeuten an Kalksalz der Glucosephosphorsäure sind geringer als bei der Rohrzuckerverbindung. Es liegt dies daran, daß die Phosphorylierung bei Gegenwart von Calciumcarbonat an sich schlechter verläuft als bei Anwesenheit von Ätzkalk. Hinzu kommt, daß beim Einengen selbst bei 40° aus der gepaarten Glucophosphorsäure dauernd Calciumphosphat wieder abgespalten wird, und schließlich hält die große Menge des entstandenen Chlorcalciums bei der Fällung mit Alkohol einen Teil des Calciumglucophosphates in Lösung.

Eine Vereinfachung der Darstellung durch Versuche, aus dem Filtrat die Hauptmenge des Chlors mit Bleiacetat und dann den Traubenzuckerphosphorsäureester mit Bleiessig und

Ammoniak niederzuschlagen, scheitert an dem Umstande, daß dem ausgefallenen Chlorblei beträchtliche Mengen Glucophosphat beigemischt sind, und anderseits daran, daß Chlor noch in Lösung bleibt.

Das Kalksalz des Glucosephosphorsäureesters ist ein weißes, luftbeständiges Pulver, das in Wasser löslich ist. Die Lösung des reinen Salzes gibt weder mit Bleizucker noch mit Bleiessig einen Niederschlag, wohl aber mit Bleiessig und Ammoniak.

An welcher Stelle die Phosphorsäure in das Traubenzuckermolekül eingetreten ist, läßt sich vorläufig so wenig wie bei der Saccharoseverbindung angeben; nur der Glucosidtypus läßt sich ausschließen, da die Verbindung glatt Fehlingsche Lösung reduziert.

Ebenso wie die Saccharosephosphorsäure gibt die Glucosephosphorsäure mit Magnesiamixtur und mit Ammoniummolybdat keine Reaktion, sondern es ist nötig, durch vorangehendes Kochen mit Mineralsäuren die Substanz zu spalten. Die Zerlegung tritt bei der Glucosephosphorsäure leichter ein. Während saccharophosphorsaurer Kalk gegen siedendes Wasser beständig ist und erst bei 160° unter Druck etwa zur Hälfte verseift wird, genügte es bei dem Calciumglucophosphat, mit Wasser im Einschlußrohr 4 Stunden lang im Dampfbade (auf 100°) zu erhitzen, um 87% der Verbindung zu spalten.

Es wurden 0,2154 g Substanz in 10 ccm Wasser gelöst und der beschriebenen Behandlung im Schießrohre unterworfen. Alsdann wurde die Flüssigkeit mit Barytwasser versetzt und sofort filtriert. Aus der Lösung des Rückstandes in verdünnter Salpetersäure wurde die Phosphorsäure mit Ammoniummolybdat gefällt und in bekannter Weise in Magnesiumpyrophosphat übergeführt.

Gewogen wurden 0,0597 g $Mg_2P_2O_7$; da 0,2154 g des Salzes 0,0684 g $Mg_2P_2O_7$ geben könnten, sind also 87,4% der in organischer Bindung vorhandenen Phosphorsäure abgespalten worden.

Das Filtrat der im Einschlußrohre erhitzten Lösung des Glucosephosphorsäureesters wurde in der Kälte mit Schwefelsäure vom Baryt befreit, die Säure mit Soda neutralisiert und alsdann wieder mit einem Tropfen Milchsäure angesäuert, um eine Gärungsprobe vornehmen zu können. Gleichzeitig wurde etwa 0,1 g des Esters mit Hefe, ein Röhrchen mit Wasser und Hefe zur

Kontrolle und ein zweites mit Traubenzucker und Hefe angesetzt. Die Kontrollproben verliefen einwandsfrei; der unverseifte Ester gor nicht, während der gespaltene Kohlensäure lieferte. Es ergibt sich also einmal, daß bei der Verseifung von Calciumglucophosphat durch siedendes Wasser Traubenzucker zurückgebildet wird, und dann auch hier die Tatsache, daß die Einführung von Phosphorsäure in den Traubenzucker die Gärfähigkeit aufhebt. Daß nicht etwa die Anwesenheit von Calcium die Hefe in ihrer Wirkung behindert, ergibt sich aus der Versuchsanordnung, die bei den Gärungsproben des Saccharosephosphorsäureesters getroffen wurde.

Saccharoseschwefelsäure.

90,0 g Rohrzucker wurden zusammen mit 80 g Stangenkali und 200 ccm Wasser gelöst und auf dem Wasserbade auf eine Temperatur von 60 bis 70° erwärmt. In diese Lösung wurden nach und nach in kleineren Portionen 64 g feingepulvertes Kaliumpyrosulfat gebracht. Das Eintragen dauert 8 Stunden, und vor jedem neuen Zusatz ist durch reichliches Schütteln für möglichste Lösung Sorge zu tragen. Man überläßt zum Schluß die Lösung 12 Stunden sich selbst, neutralisiert sie genau mit Essigsäure und fällt mit einer konzentrierten Lösung von Bariumacetat alle anorganische Schwefelsäure aus. (Man kann auch zuerst mit Barytwasser ausfällen und dann das alkalische Filtrat mit Essigsäure neutralisieren.) Der massige Bariumsulfatniederschlag muß sehr gut ausgewaschen und die infolgedessen stark verdünnte Flüssigkeit zunächst im Vakuum eingeengt werden. Bleiessig erzeugt nunmehr auf Zusatz von Ammoniak eine reichliche Fällung, die abfiltriert und bis zur neutralen Reaktion ausgewaschen wird. Der Bleiniederschlag wird dann mit Wasser angerieben und mit Schwefelwasserstoff bei Gegenwart von Bariumcarbonat vollständig zerlegt. Die filtrierte Lösung wurde im Vakuum eingeengt, klar filtriert und in Alkohol eingetropft. Der entstandene weiße, flockige Niederschlag wurde zur Entfernung anhaftenden Rohrzuckers, der ja auch durch Bleiessig und Ammoniak gefällt wird, mehrfach in Wasser gelöst und wieder mit Alkohol niedergeschlagen. Das erhaltene Bariumsaccharosulfat stellt ein durchaus luftbeständiges

weißes Pulver dar, das leicht in Wasser löslich ist. Die wässerige Lösung gibt allein mit Bleiessig und Ammoniak eine Fällung. Die Substanz reduziert Fehlingsche Mischung nicht, wohl aber nach vorherigem Kochen mit Mineralsäuren.

0,1365 g Substanz gaben 0,0573 g Asche;
0,3417 g „ „ 0,3207 g CO_2, 0,1137 g H_2O;
0,2611 g „ „ 0,2461 g CO_2, 0,0879 g H_2O;
0,1756 g „ „ nach d. Aufschließ. 0,0728 g $BaSO_4$ (Ba-Bestimm.) u. 0,0727 g $BaSO_4$ (S-Bestimm.).

Berechnet für $C_{12}H_{20}O_{10}OSO_3$: (Ba)	Gefunden:
$BaSO_4 = 41{,}83\,\%$	$41{,}97\,\%$
$Ba = 24{,}55\,\%$	$24{,}40\,\%$
$S = 5{,}73\,\%$	$5{,}69\,\%$
$C = 25{,}85\,\%$	$25{,}59\,\%$; $25{,}71\,\%$
$H = 3{,}59\,\%$	$3{,}72\,\%$; $3{,}76\,\%$.

Das Salz wird, wie zuvor auseinandergesetzt, wohl am besten als Halbsaccharat aufgefaßt.

Die Ausbeute betrug etwa 15 g.

In der Saccharoseschwefelsäure haftet die Schwefelsäure sehr fest. Zu ihrem Nachweise ist Schmelzen mit Soda und Salpeter erforderlich oder mehrmaliges Eindampfen mit Königswasser bis fast zur Trockne. Hydrolyse tritt auch beim Kochen mit Salzsäure allein ein, doch scheiden sich hierbei Huminstoffe aus, und zwar in dunklen Flocken, welche die Erkennung des ausgefallenen Bariumsulfats erschweren. Auf Zusatz von Salpetersäure bleibt die Lösung dagegen farblos.

Das Bariumsaccharosulfat dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts.

$$[\alpha]_{D\,29} = +26{,}09^\circ.$$

($\alpha = +2{,}31^\circ$; $l = 2$; in 10,2117 g Lösung waren 0,4426 g Substanz.)

Auf Zugabe von so viel kalter Salzsäure zu der Bariumverbindung, daß gerade die freie Säure entsteht, erhält man eine Flüssigkeit, die bald Fehlingsche Lösung reduziert. Daraus ist zu entnehmen, daß die freie Saccharoseschwefelsäure zersetzlich ist.

Ganz entsprechend der beschriebenen Darstellung des Bariumsalzes erhält man das Calciumsaccharosulfat, wenn man die Zerlegung der rohen Bleiverbindung der Rohrzuckerschwefelsäure in Gegenwart von kohlensaurem Calcium (statt von $BaCO_3$) vor sich gehen läßt. Das Kalksalz bildet ebenfalls ein luftbeständiges weißes Pulver und zeigt sehr ähnliche Eigenschaften.

0,1881 g Substanz gaben 0,2130 g CO_2, 0,0725 g H_2O;
0,1616 g „ „ 0,1821 g CO_2, 0,0669 g H_2O;
0,1560 g „ „ 0,0472 g Asche;
0,3903 g „ „ 0,0464 g CaO, 0,1957 g $BaSO_4$;
0,2176 g „ „ —— 0,1089 g $BaSO_4$.

Berechnet für $C_{12}H_{20}O_{10}OSO_3$: (—Ca—)	Gefunden:
$CaSO_4$ = 29,56 %	30,05 %
Ca = 8,69 %	8,50 %
S = 6,95 %	6,88 %; 6,87 %
C = 31,31 %	30,88 %; 30,73 %
H = 4,35 %	4,22 %; 4,59 %.

Die Lösungen von saccharoseschwefelsauren Salzen geben die Farbenreaktionen des Rohrzuckers.

Das Calciumsalz diente zu Versuchen über die Gärbarkeit der Saccharoseschwefelsäure. Eine Lösung von 0,3 g des Salzes in 10 ccm Wasser entwickelt innerhalb 24 Stunden mit Hefe deutlich Kohlensäure; allein die Menge des Kohlendioxyds ist sichtlich geringer als die in einer Kontrollprobe mit 0,1 g Rohrzucker. Eine vorher mit Salzsäure invertierte und neutralisierte Lösung des Calciumsaccharosulfats zeigt starke Gärung.

Bemerkenswert sind die Eigenschaften, die das Gärgut dieses durch Hefe nur zum Teil angegriffenen saccharoseschwefelsauren Calciums aufweist.

1. Die mit kolloidalem Ferrihydroxyd von Hefenpartikeln befreite[1]) Flüssigkeit reduziert schwach Fehlingsche Mischung; Schwefelsäure ist nicht abgespalten, ein großer Teil des Salzes ist noch unzerlegt und unvergoren (starke Zunahme des Reduktionsvermögens nach dem Kochen mit Mineralsäuren, positiver Ausfall

[1]) C. Neuberg, Biochem. Zeitschr. 24, 424 und 431, 1910.

der Reaktionen von Molisch und von Seliwanoff sowie allmähliche Abspaltung von H_2SO_4). 2. Es tritt manchmal unverkennbar der Geruch nach Schwefelwasserstoff auf; säuert man die klare Lösung mit verdünnter Salzsäure an, so bleibt sie durchsichtig, beim Kochen erfolgt jedoch nach kurzer Zeit eine allmählich stärker werdende Abscheidung von kolloidalem Schwefel; man wird am ehesten an Thiosulfat als dessen Muttersubstanz zu denken haben. Beim Kochen mit alkalischer Bleilösung stellt sich Schwärzung ein, das Schwefelblei haftet an dem gleichzeitig entstehenden farblosen Niederschlag von Phosphaten und Gips.

B. Über die Phosphorylierung von Eiweiß und die Bindung des Phosphors in den natürlichen Phosphorproteinen.

Die Verbindungen von Kohlenhydraten mit Phosphorsäure sind unzweifelhaft als Ester aufzufassen.[1]) Dagegen liegen über die Form der Verknüpfung des Phosphors in den Phosphorproteinen bisher keine entscheidenden Angaben vor. Sicher ist, daß der Phosphor in diesen Verbindungen als ein Derivat der Phosphorsäure enthalten ist, denn die Totalhydrolyse durch Säuren oder Alkalien liefert gewöhnliche H_3PO_4, und zu dem gleichen Ergebnis führt die Einwirkung von Verdauungsenzymen.[2]) Da es sich jedoch unzweifelhaft nicht um phosphorsaure Salze, um Eiweißphosphate, handelt, kommen vornehmlich zwei Möglichkeiten in Betracht.

1. Entweder ist die Phosphorsäure esterartig mit Hydroxylgruppen bestimmter Eiweißbausteine verknüpft. Solche hydroxylierten Aminosäuren liegen im Tyrosin, dann in den eigentlichen Oxyaminosäuren, wie Serin, Oxypyrrolidincarbonsäure und Diaminotrioxydodecansäure, vor.

Oder 2. die Phosphorsäure tritt mit Amino- bzw. Iminogruppen des Eiweißes zu säureamidähnlichen Ver-

---

[1]) Siehe vorher.

[2]) Siehe bei R. H. Aders und W. M. Bayliss, Journ. of Physiol. 33, 439, 1906.

bindungen, zu Substitutionsprodukten der Phosphaminsäure $NH_2.PO(OH)_2$ bzw. des Phosphamids $OP(NH_2)_3$ oder analoger Aminophosphorsäureverbindungen, zusammen. Eine Entscheidung zwischen beiden Verknüpfungsmöglichkeiten ist, wie bemerkt, bisher nicht getroffen.

Die Tatsache, daß die für die Ernährung des jugendlichen Organismus wichtigsten Nährstoffe phosphorhaltig sind, wie das Casein der Milch, das Vitellin des Eidotters und die Phytoglobuline in den Reservestoffen der Pflanzensamen, zeigt ohne weiteres die hohe Bedeutung der Phosphoreiweißverbindungen; sind sie es doch, die zur ersten Bildung des Knochengerüstes, der Nucleinsäuren, der phosphorhaltigen Zellglobuline und der Phosphatide beitragen.

Sowohl hinsichtlich der Auffassung der natürlichen Phosphorproteine wie in mancher anderen Hinsicht bietet eine künstliche Verknüpfung von Phosphorsäure mit Aminosäuren bzw. mit Eiweißstoffen ein Interesse.

Es gestaltet sich jedoch die Einführung von anorganischen Säureresten, speziell von Phosphorsäure, hier schwieriger als bei den Zuckern.

Behandelt man unter Eiskühlung die Lösungen einfacher Aminosäuren, z. B. von Glykokoll, Alanin, Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure, Serin, Diaminopropionsäure, mit Phosphoroxychlorid (in Chloroformlösung) bei Gegenwart von Laugen, Erdalkalien oder besser Erdalkalicarbonaten, so läßt sich auch hier mit Leichtigkeit die Entstehung einer organischen Phosphorsäureverbindung dartun. Denn entfernt man die anorganischen Phosphate mit Magnesiamixtur, so findet sich in der Lösung noch Phosphor, der erst nach der Veraschung nachweisbar wird. Allein die Isolierung der Aminosäuren-Phosphorsäureverbindungen in völlig reinem Zustande ist bisher nicht gelungen. Unter den Bedingungen, die eine Abscheidung der anorganischen Phosphorsäure ermöglichen, z. B. Ausfällung mit Barytsalzen, wird auch aus der gepaarten Verbindung Phosphorsäure zum Teil wieder abgespalten, und die völlige Trennung von unveränderter Aminosäure und phosphoryliertem Produkt ist gleichfalls bislang nicht möglich gewesen. Dieses Verhalten, insbesondere die lockere Verbindung der Phosphorsäure, erinnert weitgehend an die entsprechenden Eigenschaften der durch Ferment-

hydrolyse aus den natürlichen Phosphorproteinen erhaltenen phosphorhaltigen Proteosen. Die phosphorhaltigen Caseinalbumosen, deren bestbekannter Vertreter die Paranucleinsäure von E. Salkowski[1]) ist, sowie die nahe verwandten Substanzen von A. Reh[2]) spalten auch leicht Phosphorsäure ab; die Bindung der Phosphorsäure scheint noch lockerer zu sein, wenn man den Abbau über die Albumosenstufe hinaus ausdehnt, indem bisher phosphorhaltige niedere Aminosäurenverbände[3]) bei der Hydrolyse nicht isolierbar gewesen sind.

Dagegen scheint sich mit zunehmender Molekulargröße, z. B. bei den Proteinen selbst, auch die Haftfestigkeit der Phosphorsäure zu erhöhen. Aus diesem Grunde haben sich die erwähnten Schwierigkeiten der Isolierung umgehen lassen, wenn man die Reaktion mit phosphorsäurefreien Eiweißkörpern, z. B. mit Blutglobulin oder Lactalbumin, vornimmt. Dann erhält man ohne weiteres phosphorylierte Produkte, für die man einen ähnlichen Bau annehmen muß, wie für die natürlichen Phosphorproteine zuvor ausgeführt worden ist.

Allem Anscheine nach ist die Zahl der Amid- bzw. Imidgruppen im Eiweiß größer als die der OH-Reste, und da auch hydroxylfreie Aminosäuren (s. o.) phosphorylierbar sind, dürfte die Auffassung der natürlichen Posphorproteine als Abkömmlinge einer Phosphaminsäure[4]) den Tatsachen am meisten entsprechen.

Die Isolierung der künstlichen Phosphoreiweißverbindungen wird durch den Umstand erleichtert, daß man aus mit Phosphoroxychlorid unter Kühlung behandelten Eiweißlösungen die Phosphorylierungsprodukte durch Ansäuern mit Essigsäure usw. zur Abscheidung bringen kann, wobei natürlich die Alkaliphosphate in Lösung bleiben.

Durch einen besonderen Versuch haben wir uns überzeugt, daß bei der Ausfällung von Eiweiß aus alkalischer Lösung durch Essigsäure bei Gegenwart von Alkaliphosphaten keine phosphorhaltigen Niederschläge, keine Proteinphosphate, entstehen. Auch hiervon abgesehen, zeigen die mit Phosphoroxychlorid erhaltenen Verbindungen durchaus

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 297, 1899; 32, 245, 1901.

[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 1, 1901.

[3]) Versuche hierüber sind im Gange.

[4]) Eine analoge Konstitution dürfte für bestimmte Aminophosphatide in Betracht zu ziehen sein.

den Charakter von substituierten Phosphaminsäuren, nicht von phosphorsauren Salzen.

Die künstlichen Phosphoreiweißverbindungen ähneln den natürlichen Phosphorproteinen in der Zusammensetzung und im Verhalten, auch insofern als sie durch peptisches und tryptisches Ferment verdaut werden.

Experimentelles.

Wie eingangs erwähnt, hat die Phosphorylierung der Aminosäuren bisher nicht zu ganz reinen Substanzen geführt. Deshalb sei lediglich die Einführung von Phosphorsäure in native Eiweißkörper beschrieben.

Die Einwirkung von Phosphoroxychlorid auf Eiereiweiß hat vor Jahren bereits Bechhold[1]) studiert. Er hat jedoch ohne Kühlung und mit unverdünntem Halogenphosphor gearbeitet. Dabei findet nach des Autors Angaben beträchtliche Erhitzung statt, und es kommt zur Spaltung sowie Schwefelwasserstoffentwicklung, d. h. zu partieller Zersetzung des Eiereiweißes.

Benutzt haben wir: Lactalbumin sowie Blutglobulin, bei denen die Reaktion in gleicher Weise verlief. Erfahrungsgemäß haftet den natürlichen Proteinen häufig Calciumphosphat an. Die angewandten Eiweißkörper waren in bekannter Weise derart gereinigt, daß sie nicht mehr als Spuren von Phosphor enthielten, insbesondere gaben 4,0 g des Lactalbumins nach der Schmelze mit Soda-Salpeter mit Ammoniummolybdat in salpetersaurer Lösung nur eine Gelbfärbung, aber keine Fällung.

7,5 g staubfeines Lactalbumin wurden in 100 ccm Wasser suspendiert und in kleinen Portionen mit so viel einer Lösung von 16,8 g Ätzkali in 300 ccm Wasser versetzt, daß bei heftigem Schütteln, ev. unter gelindem Erwärmen auf 30°, so schnell als möglich Lösung eintrat. Zu der in einer Kältemischung dann stark gekühlten Flüssigkeit wurde unter stetem Schütteln allmählich eine Mischung von 16 g Phosphoroxychlorid in 80 ccm Chloroform[2]) getropft und dabei nach und nach der Rest der genannten

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 122, 1901.

[2]) Die Eiweiß fällende Wirkung des Chloroforms (E. Salkowski, Deutsch. med. Wochenschr. 1888, Nr. 16; Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 329, 1900) kommt in den alkalischen Lösungen nicht zur Geltung.

Lauge sowie weitere 16,8 g Kaliumhydroxyd in 100 ccm Wasser hinzugefügt. Die Prozedur erfordert etwa 4 bis 6 Stunden. Dann wird das Chloroform im Scheidetrichter abgelassen und aus der klar filtrierten Lösung sofort durch Zusatz von Essigsäure bis zur gerade deutlichen sauren Reaktion das phosphorylierte Produkt gefällt. Die Abscheidung kann durch Eintragen von Kochsalz oder von Ammoniumsulfat vervollständigt werden. Auch kurzes Erwärmen auf dem Wasserbade ist empfehlenswert.

Die in weißen Flocken ausgefallene Substanz wird abfiltriert, auf dem Filter mit Wasser bis zum Verschwinden der Reaktionen auf Phosphorsäure und Chlor ausgewaschen und dann mit Alkohol und Äther behandelt. Es resultiert ein weißes Pulver, das nach dem Trocknen schwach gelb erscheint.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 105° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Präparat I.

0,4796 g Substanz ergaben (nach Kjeldahl) 0,0740 g N.
1,4066 g Substanz ergaben 0,0634 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0176 g P).

Präparat II.

0,4971 g Substanz ergaben (nach Kjeldahl): 0,0783 g N,
0,1803 g „ „ (nach Dumas): 24,6 ccm N, bei 18°, 757 mm (= 0,0283 g N);
0,1212 g „ „ 0,2333 g CO_2, 0,0774 g H_2O;
1,5115 g „ „ 0,0694 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0193 g P);
1,2132 g „ „ 0,0688 g $BaSO_4$ (= 0,00945 g S).

C = 52,49; H = 7,09; N = 15,51; P = 1,25; S = 0,78%;
N = 15,75; P = 1,28;
N = 15,69.

Die Ausbeute betrug 3,7 g.

Es läßt sich natürlich nicht ohne weiteres behaupten, daß die phosphorylierte Verbindung frei vom Ausgangsmaterial ist. Sie verändert jedoch durch Umfällen aus Kalilauge mit Essigsäure ihre Zusammensetzung nicht. Im Gegensatz zum Lactalbumin hat das phosphorylierte Produkt wie die natürlichen Nucleoalbumine deutlich saure Eigenschaften. Beachtenswert ist, daß die elementare Zusammensetzung des wichtigsten Phos-

phorproteins, des Caseins (C = 52,96, H = 7,05, N = 15,65, P = 0,85, S = 0,76%, nach Hammarsten[1]) sehr ähnlich ist.

Ausgehend von dem Gedanken, daß Veränderungen im Ausfall der bekannten Eiweißreaktionen einen Anhalt für den Ort des Phosphorsäureeintritts abgeben könnten, haben wir das Verhalten des phosphorylierten Lactalbumins nach dieser Richtung geprüft. Die Biuret-, Xanthoprotein-, Schwefelbleiprobe, die Reaktionen nach Millon, v. Liebermann sowie Hopkins und Cole traten jedoch durchaus in der gewöhnlichen Weise ein.

Die Verdaubarkeit durch tryptisches Ferment ist durch die Phosphorylierung nicht aufgehoben. 1,0 g der feingepulverten Substanz, die unter Zusatz von 1 Tropfen verdünnten Ammoniaks und von Chloroform in 15 ccm Wasser suspendiert war, wurde bei 38° durch Pankreatin (Rhenania) in 24 Stunden völlig gelöst; nach dieser Zeit ist auch die Abspaltung von anorganischer Phosphorsäure schon recht deutlich. Ob es sich hierbei einfach um die Wirkung des Trypsins oder einer besonderen Phosphaminase handelt, ist vorläufig unentschieden.

Anders verläuft die peptische Verdauung. Aus E. Salkowskis (l. c.) Arbeiten mit Casein geht hervor, daß je nach dem Zeitpunkte, wo man die Einwirkung des Magensaftes unterbricht, phosphorhaltige oder phosphorfreie Albumosen entstehen. Ganz ebenso verhält sich das künstlich phosphorylierte Lactalbumin.

Digeriert man 3 g des Produktes mit 100 ccm kräftiger Pepsinsalzsäure, so ist nach 48stündigem Stehen bei 38° fast alles gelöst. In dem klar filtrierten Verdauungsgemische ist keine anorganische Phosphorsäure vorhanden. Stumpft man die salzsaure Reaktion mit Soda ab, so erhält man durch Ferriammonsulfat bei gelindem Erwärmen einen reichlichen Niederschlag der Eisenverbindung einer P-haltigen Albumose, die der Paranucleinsäure Salkowskis aus Casein sehr ähnlich ist. Auch Uranylacetat erzeugt eine Fällung, die das Salz einer organischen Phosphorsäureverbindung ist.

Dehnt man die Pepsinverdauung auf 4 bis 8 Tage aus, so ist abgespaltene Orthophosphorsäure deutlich nachweisbar.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 227, 1883; 9, 273, 1885.

Durch Erwärmen mit Lauge wird ebenfalls Phosphorsäure losgelöst. Dagegen gibt die phosphorylierte Substanz an siedendes Wasser keine Spur H_3PO_4 ab. Dadurch unterscheidet sie sich scharf von den (durch Metaphosphorsäure entstehenden) Eiweißphosphaten, die nach E. Fuld[1]) zum charakteristischen Unterschiede von Casein beim Kochen mit Wasser alle Phosphorsäure verlieren und sie auch bei kurzdauernder Pepsinverdauung sofort als Orthophosphorsäure abspalten.

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 155, 1902.

Die vorliegende Arbeit habe ich auf Anregung von Herrn Prof. Dr. C. Neuberg im Herbst 1907 begonnen und mit mehreren Unterbrechungen durch Militärdienst und Assistenz im Frühjahr 1910 in der chemischen Abteilung des Königlichen Tierphysiologischen Instituts der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin (Direktor Geh. Rat Prof. Dr. N. Zuntz) beendet.

Herrn Professor Neuberg danke ich ganz besonders für die mir gewährte Anregung und Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit.

Lebenslauf.

Ich, Hermann Pollak, Jude, bin als Sohn des Kaufmanns Richard Pollak und dessen Ehefrau Rosa am 20. März 1884 zu Wiesbaden geboren. Dort besuchte ich die Vorschule und das Realgymnasium, bis ich im Jahre 1902 nach meinem Abiturium die Universität zu München bezog. An dieser Universität, wie auch an der Berliner habe ich nach einigen allgemeinen naturwissenschaftlichen Studien mich besonders mit der Chemie beschäftigt. Zwischendurch war ich als Privatassistent in der Königl. Charité und als Assistent am Städtischen Krankenhaus zu Wiesbaden tätig. Vom Oktober 1908 bis 1909 genügte ich meiner Militärpflicht. Die Promotionsprüfung bestand ich cum laude am 28. Juli 1910.

Allen meinen Lehrern danke ich auch an dieser Stelle für die mir zuteil gewordenen Belehrungen.